

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



10/507548
REC'D 15 APR 2003
WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 11 555.9

Anmeldetag: 15. März 2002

Anmelder/Inhaber: IMTM Institut für Medizintechnologie Magdeburg
GmbH, Magdeburg/DE;
Professor Dr. Siegfried Ansoerge, Hohenwarthe/DE;
Professor Dr. Klaus Neubert, Halle/DE;
Professor Dr. Harald Gollnick, Magdeburg/DE;
Professor Dr. Christos C. Zouboulis, Berlin/DE.

Bezeichnung: Verwendung der Inhibitoren von Enzymen mit
Aktivitäten der Aminopeptidase N und/oder der
Dipeptidylpeptidase IV und pharmazeutischen
Zubereitungen daraus zur Therapie und Prävention
dermatologischer Erkrankungen mit sebozytärer
Hyperproliferation und veränderten
Differenzierungszuständen

IPC: A 61 K 38/05

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. März 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hiebinger.

**Verwendung der Inhibitoren von Enzymen mit Aktivitäten der
Aminopeptidase N und/oder der Dipeptidylpeptidase IV und
pharmazeutischen Zubereitungen daraus zur Therapie und Prävention
dermatologischer Erkrankungen mit sebozytärer Hyperproliferation und
veränderten Differenzierungszuständen**

Die Erfindung beschreibt die Hemmung der für die Proliferation notwendigen DNA-Synthese von Sebozyten durch die Wirkung von Inhibitoren der Aminopeptidase N (APN, EC3.4.11.2, CD13) oder/und der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, EC 3.4.14.5, CD26) im Ergebnis der einzelnen, simultanen oder zeitlich unmittelbar aufeinanderfolgenden Applikation von jeweils spezifischen Inhibitoren dieser Enzyme oder Enzymen gleicher Substratspezifität (APN- oder/und DP IV-analoge Enzymaktivität) auf der Basis von Aminosäurederivaten, Peptiden oder Peptidderivaten, durch welche die Proliferation (DNA-Synthese) von Sebozyten supprimiert wird.

Eine Reihe dermatologischer Erkrankungen gehen mit sebozytärer Hyperproliferation und veränderten Differenzierungszuständen einher. Zu ihnen gehören sowohl benigne follikuläre Hyperproliferationszustände (Akne, akneiforme follikuläre Reaktionen, Steatocystoma multiplex, Talgdrüsen-Naevi, senile Talgdrüsen-hypertrophie, Seborrhoe der Haut und Haare) als auch maligne follikuläre Hyperproliferationszustände (Mischtumoren, Sebaceome, Talgdrüsen-Tumoren, Talgdrüsen-CA).

Peptidasen wie die Dipeptidylpeptidase IV und die Aminopeptidase N oder ähnlich wirkende Enzyme sind für die Regulation bzw. Modulation von Wechselwirkungen zwischen Zellen besonders interessant, da sie u. a. als Ektoenzyme in der Plasmamembran der Zellen lokalisiert sind, Interaktionen mit anderen extrazellulären Strukturen eingehen, peptiderge Botenstoffe durch enzymkatalysierte Hydrolyse aktivieren bzw. inaktivieren und dadurch wichtig für die Zell-Zell-

Kommunikation sind [Yaron A, et al.: Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1993;28:31-81; Vanhoof G, et al.: Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J* 1995;9:736-744].

Es ist gezeigt worden, dass im Prozess der Aktivierung und klonalen Expansion von Immunzellen, insbesondere von T-Lymphozyten, membranständige Peptidasen wie DP IV oder APN eine Schlüsselrolle spielen [Fleischer B: CD26 a surface protease involved in T-cell activation. *Immunology Today* 1994; 15:180-184; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells. *International Journal of Molecular Medicine* 1999; 4:17-27; Riemann D et al.: CD13 - not just a marker in leukemia typing. *Immunology Today* 1999; 20:83-88]. Verschiedene Funktionen Mitogen-stimulierter mononukleärer Zellen (MNZ) oder angereicherter T-Lymphozyten wie DNA-Synthese, Produktion und Sekretion von immunstimulierenden Zytokinen (IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ) und Helferfunktionen für B-Zellen (IgG- und IgM-Synthese) können in Gegenwart von spezifischen Inhibitoren der DP IV oder der APN gehemmt werden [Schön E et al.: The dipeptidyl peptidase IV, a membrane enzyme involved in the proliferation of T lymphocytes. *Biomed. Biochim. Acta* 1985; 2: K9-K15; Schön E et al.: The role of dipeptidyl peptidase IV in human T lymphocyte activation. Inhibitors and antibodies against dipeptidyl peptidase IV suppress lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis in vitro. *Eur. J. Immunol.* 1987; 17: 1821-1826; Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. *Immunology* 1997; 91: 354-360; Lendeckel U et al.: Induction of the membrane alanyl aminopeptidase gene and surface expression in human T-cells by mitogenic activation. *Biochem. J.* 1996; 319: 817-823; Kähne T et al.: Dipeptidyl peptidase IV: A cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (Review). *Int. J. Mol. Med.* 1999; 4: 3-15; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (Review). *Int. J. Mol. Med.* 1999; 4: 17-27]. Es ist bereits bekannt, daß die Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßung

durch Hemmung der auf Immunzellen lokalisierten Dipeptidylpeptidase IV mit Hilfe von synthetischen Inhibitoren möglich ist (z. B. EP764151 A1, WO09529691, EP731789 A1, EP528858).

Der Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, dass die einzelne oder gleichzeitige Wirkung von Inhibitoren der auf bzw. in Sebozyten exprimierten Dipeptidylpeptidase IV/CD26 und Aminopeptidase N/CD13 oder Enzyme gleicher Substratspezifität (APN- oder/und DP IV-analoge Enzymaktivität), die Proliferation (DNA-Synthese) dieser Zellen hemmt.

Unsere Erfindung zeigt, dass zur Therapie und zur Prävention von dermatologischen Erkrankungen mit sebozytärer Hyperproliferation und veränderten Differenzierungszuständen (benigne follikuläre Hyperproliferationszustände wie Akne, akneiforme follikuläre Reaktionen, Steatocystoma multiplex, Talgdrüsen-Naevi, senile Talgdrüsenhypertrophie, Seborrhoe der Haut und Haare als auch maligne follikuläre Hyperproliferationszustände wie Mischtumoren, Sebaceome, Talgdrüsen-Tumoren, Talgdrüsen-CA), für deren Entstehung die Proliferation von Sebozyten eine zentrale Bedeutung hat, die einzelne oder gleichzeitige Applikation von Hemmstoffen der DP IV und der APN oder Enzymen gleicher Substratspezifität (APN- oder/und DP IV-analoge Enzymaktivität) bzw. entsprechender Zubereitungen und Darreichungsformen daraus geeignet sind.

Im einzelnen liegen der Erfindung die Befunde zugrunde, dass die DNA-Synthese von Sebozyten durch die Gabe von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV oder/und der Aminopeptidase N signifikant inhibiert wird.

Die oben genannten Erkrankungen werden bisher topisch und/oder systemisch mit Antibiotika und/oder antiproliferativen und differenzierenden Substanzen (Antiandrogenen, 13-cis-Retinsäure u. a) behandelt. Insbesondere bei der systemischen Anwendung treten häufig unerwünschte Nebenwirkungen auf. Dies

sind u. a. Teratogenität, Lipidstoffwechselstörungen, psychoreaktive Erscheinungen, gastrointestinale Beschwerden sowie muco-cutane irritative Reaktionen.

Der Einsatz von DP IV- oder/und APN-Inhibitoren würde bei den genannten Erkrankungen eine gänzlich neuartige, vorraussichtlich sehr effektive, möglicherweise kostengünstige Therapieform und einen wertvollen alternativen Bestandteil der bestehenden Therapiekonzepte darstellen.

Die erfindungsgemäß applizierten Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV oder/und der Aminopeptidase N oder Enzymen gleicher Substratspezifität (APN- oder/und DP IV-analoge Enzymaktivität) können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, inhibitorisch wirkende Peptide und Peptidderivate sowie als Antikörper dieser Enzyme zur Anwendung kommen.

Bevorzugte Effektoren sind beispielsweise für die DP IV Xaa-Pro-Dipeptide, entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäure-diarylester und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)_n-Peptide (n=0-10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine α -Aminosäure/Iminosäure bzw. ein α -Aminosäurederivat/Iminosäurederivat, vorzugsweise N^ε-4-Nitrobenzyl-oxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z.B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate. Derartige Verbindungen und deren Herstellung wurden in einem früheren Patent beschrieben (K. Neubert et al. DD296075A5). Bevorzugte Inhibitoren für die Alanyl-Aminopeptidase sind Bestatin (Ubenimex), Actinonin, Probestin, Phebestin, RB3014 oder Leuhistin.

Die Inhibitoren werden simultan mit bekannten Trägerstoffen verabreicht. Die Verabreichung erfolgt einerseits als topische Applikation in Form von z.B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Lipo- und Nanosomen,

Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden, Pflaster und ähnliche neue Trägersubstrate, Jet-Injektion bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln einschließlich instillativer Applikation und andererseits als systemische Applikation zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären Anwendung in geeigneten Rezepturen bzw. in geeigneter Galenik.

Ausführungsbeispiel 1

Inhibierung der DNA-Synthese der immortalisierten humanen Sebozytenzelllinie SZ95 durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV oder/und der APN

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die DNA-Synthese der immortalisierten humanen Sebozytenzelllinie SZ95 (Zouboulis C.C. et al: Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). J. Invest. Dermatol. 1999, 113: 1011-1020) durch die Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid) oder/und der APN (Actinonin) dosisabhängig gehemmt wird.

Die humane Sebozytenzelllinie SZ95, welche als Zellmodell für die Akne akzeptiert ist, exprimiert stark DP IV und APN (Abb. 1). Die Enzymaktivität der DP IV von vitalen Zellen beträgt 38 ± 18 pkat/10⁶ Zellen, die der APN beträgt 262 ± 58 pkat/10⁶ Zellen (n = 3). Entsprechend ist die mRNA von APN und DP IV auf diesen Zellen nachweisbar (Abb. 2).

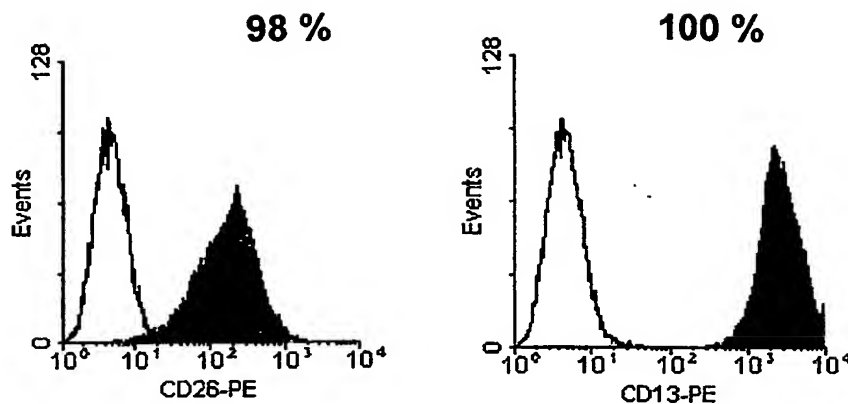


Abb. 1: Durchflußzytometrischer Nachweis der Expression von DP IV (CD26) und APN (CD13) auf SZ95-Zellen

SZ95-Zellen wurden 48 h mit den oben genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Inkorporation die DNA-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360). Abbildung 2 zeigt die dosisabhängige Hemmung der DNA-Synthese.

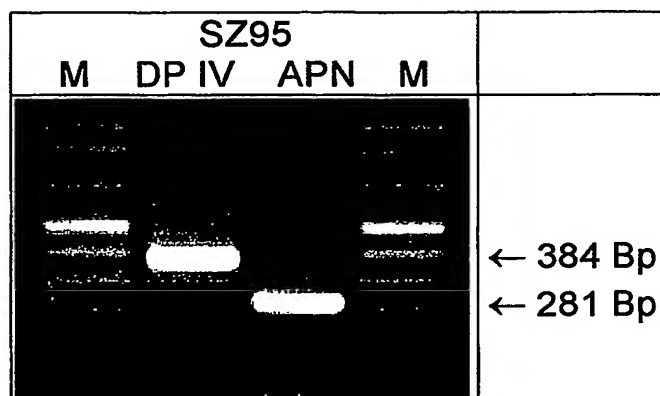


Abb. 2: Nachweis der mRNA-Expression von DP IV (CD26) und APN (CD13) auf SZ95-Zellen mittels RT-PCR

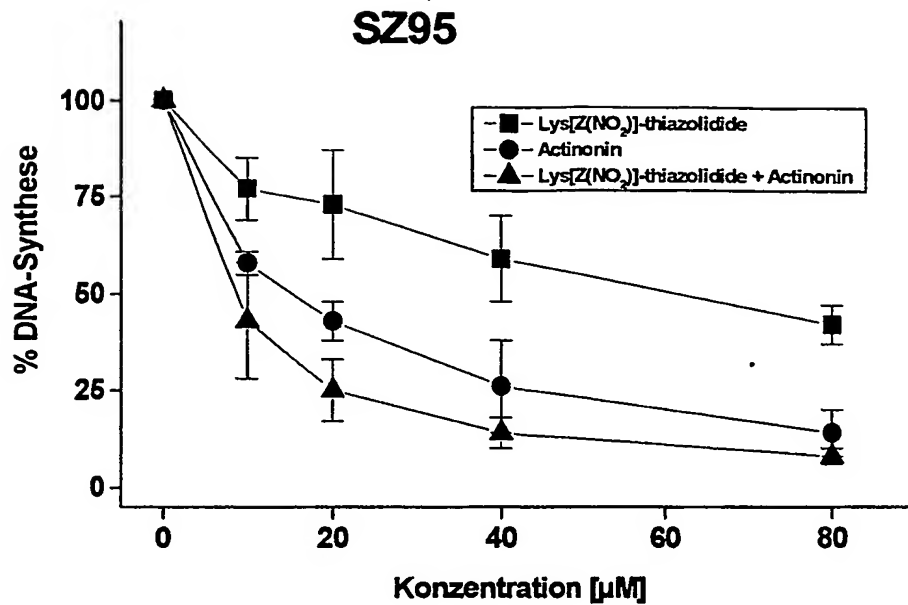


Abb. 3: Dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid) und der Aminopeptidase N (Actinonin) auf die DNA-Synthese humaner SZ95-Sebozyten.

Die Zellen wurden über 48 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium ³[H]-Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNA eingebaute Menge an ³[H]-Thymidin gemessen.

Patentansprüche

1. Verwendung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) sowie von Enzymen mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) oder/und von Inhibitoren der Alanyl-Aminopeptidase (Aminopeptidase N, APN) bzw. Enzymen gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität) zur Hemmung der Proliferation (DNA-Synthese) humaner Sebozyten.
2. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Inhibitoren der DP IV bevorzugt Xaa-Pro-Dipeptide (Xaa = α -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat), entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester, Dipeptidboronsäuren (z.B. Pro-boro-Pro) und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)_n-Peptide (Xaa = α -Aminosäure, n = 0-10), entsprechende Derivate und deren Salze, Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine α -Aminosäure bzw. ein seitenkettengeschütztes Derivat, vorzugsweise N^ε-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Tryptophan, L-Prolin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z.B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren, Tryptophan-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure-derivate (TSL) und (2S,2S',2S'')-2-[2'-[2''-amino-3'''-(indol-3'''-yl)-1''-oxopropyl]-1',2',3',4'-tetrahydro-6'8'-dihydroxy-7-methoxyisochinolin-3-yl-carbonyl-amino]-4-hydromethyl-5-hydropentansäure (TMC-2A) sind.
3. Verwendung nach Anspruch 1, worin Aminosäureamide, z.B. N^ε-4-Nitrobenzyloxy-carbonyl-L-Lysin-thiazolidid, -pyrrolidid und -piperidid sowie das entsprechende 2-Cyanothiazolidid-, 2-Cyanopyrrolidid- und 2-Cyanopiperidid-derivat bevorzugt als DP IV-Inhibitoren eingesetzt werden.
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei als Inhibitoren der APN bevorzugt Actinin, Leuhistin, Phebestin, Amastatin, Bestatin, Probestin, β -Aminothirole, α -Ami-

nophosphinsäuren, α -Aminophosphinsäurederivate, vorzugsweise D-Phe- Ψ PO(OH)-CH₂]-Phe-Phe und deren Salze fungieren.

5. Verwendung von Inhibitorkombinationen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Vorbeugung und Therapie von sowohl benignen follikulären Hyperproliferationszuständen (Akne, akneiforme follikuläre Reaktionen, Steatocystoma multiplex, Talgdrüsen-Naevi, senile Talgdrüsenhypertrophie, Seborrhoe der Haut und Haare, SAHA-Syndrom [Seborrhoe, Akne, Hirsutismus, Alopecie]) als auch malignen follikulären Hyperproliferationszuständen (Mischtumoren, Sebaceome, Nävus sebaceus mit maligner Entwicklung, Talgdrüsen-Tumoren, Talgdrüsen-CA).

6. Pharmazeutische Zubereitungen, umfassend Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) oder DP IV-analoger Enzymaktivität oder/und Inhibitoren der Alanyl-Aminopeptidase (Aminopeptidase N, APN) bzw. Enzyme gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität) und in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Zusatz- und/oder Hilfsstoffen. X

7. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 6, umfassend als Inhibitoren der DP IV bevorzugt Xaa-Pro-Dipeptide (Xaa = α -Aminosäure bzw. seitenkettengeschützte Derivate), entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)_n-Peptide (Xaa = α -Aminosäuren, n=0-10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine α -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat, vorzugsweise N^ε-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Tryptophan, L-Prolin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z.B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren.

8. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 6, umfassend als Inhibitoren der DP IV vorzugsweise Aminosäureamide, z.B. N^ε-4-Nitrobenzyloxy-carbonyl-L-

Lysin-thiazolidid, -pyrrolidid und -piperidid sowie das entsprechende 2-Cyanothiazolidid-, 2-Cyanopyrrolidid- und 2-Cyanopiperididderivat.

9. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 6 umfassend als Inhibitoren der APN vorzugsweise Actinoin, Leuhistin, Phebestin, Amastin, Bestatin, Probestin, β -Aminothirole, α -Aminophosphinsäuren, α -Aminophosphinsäurederivate, bevorzugt D-Phe- ψ [PO(OH)-CH₂]-Phe-Phe und deren Salze.
10. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 6 bis 9, umfassend zwei oder mehrere der Inhibitoren der DP IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität oder/und der APN bzw. APN-analoger Enzymaktivität in räumlich getrennter Formulierung in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen zur gleichzeitigen oder zeitlich unmittelbar aufeinanderfolgenden Verabreichung mit dem Ziel einer gemeinsamen Wirkung.
11. Pharmazeutische Zubereitung gemäß Ansprüche 6 bis 10 für die systemische Anwendung zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären, rektalen, vaginalen, sublingualen Applikation zusammen mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen.
12. Pharmazeutische Zubereitung gemäß Ansprüche 7 bis 10 für die topische Anwendung in Form von z.B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Lipo- bzw. Nanosomen, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/ Vehikeln, einschließlich instillativer Applikation.

Zusammenfassung

Verwendung der Inhibitoren von Enzymen mit Aktivitäten der Aminopeptidase N und/oder der Dipeptidylpeptidase IV und pharmazeutischen Zubereitungen daraus zur Therapie und Prävention dermatologischer Erkrankungen mit sebozytärer Hyperproliferation und veränderten Differenzierungszuständen

Die Erfindung beinhaltet ein Verfahren, zur Hemmung der für die Proliferation notwendigen DNA-Synthese von humanen Sebozyten durch die alleinige oder gemeinsame Wirkung von Inhibitoren der von diesen Zellen exprimierten Alanyl-Aminopeptidase (APN) und Dipeptidylpeptidase IV (DP IV). Die DNA-Synthese (Proliferation) humaner Sebozyten wird durch Gabe von Inhibitoren der APN oder/und der DP IV dosisabhängig gehemmt. Unsere Erfindung zeigt, dass zur Therapie und Prävention von dermatologischen Erkrankungen mit sebozytärer Hyperproliferation und veränderten Differenzierungszuständen die Applikation von Hemmstoffen der oben genannten Enzyme bzw. entsprechender Zubereitungen und Darreichungsformen daraus geeignet sind.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.